北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

檀香烯合酶基因启动子克隆及其活性分析

周慧文 丘立杭 闫海锋

Cloning and its activity analysis of santalene synthase gene (*SaSSy*) promoter from *Santalum album*

Zhou Huiwen, Qiu Lihang, Yan Haifeng

引用本文:
周慧文, 丘立杭, 闫海锋. 檀香烯合酶基因启动子克隆及其活性分析[J]. 北京林业大学学报, 2026, 48(6):49–58. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250429
Zhou Huiwen, Qiu Lihang, Yan Haifeng. Cloning and its activity analysis of santalene synthase gene (*SaSSy*) promoter from *Santalum album*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(6):49–58. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250429

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250429

您可能感兴趣的其他文章
Articles you may be interested in

白桦*BpSPL6*基因启动子的克隆及表达分析
Cloning and expression analysis of *BpSPL6* promoter from *Betula platyphylla*
北京林业大学学报, 2022, 44(2): 1–10. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200174

核桃*JrTT1–1*启动子不同长度片段响应干旱的活性分析
Activity analysis of different length fragments of walnut *JrTT1–1* promoter in response to drought stress
北京林业大学学报, 2022, 44(8): 31–38. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210126

栾树查尔酮合酶基因克隆与表达分析
Cloning and expression analysis of chalcone synthase gene from *Koelreuteria paniculata*
北京林业大学学报, 2021, 43(3): 27–35. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200377

山新杨谷胱甘肽S–转移酶编码基因*PdbGSTU*功能分析
Functional analysis of encoding gene *PdbGSTU* for glutathione S–transferase in *Populus davidiana* × *P. bolleana*
北京林业大学学报, 2024, 46(8): 68–78. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240020

毛果杨丝氨酸蛋白酶抑制子PtrSPI的抗虫能力分析
Analysis of insect resistance ability of the serine protease inhibitor PtrSPI from *Populus tomentosa*
北京林业大学学报, 2021, 43(9): 51–58. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210163

无患子*SmCYCD3;2*基因的克隆与功能研究
Cloning and functional studies on *SmCYCD3;2* gene in *Sapindus mukorossi*
北京林业大学学报, 2025, 47(12): 87–96. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250125

DOI:10.12171/j.1000−1522.20250429

檀香烯合酶基因启动子克隆及其活性分析

周慧文　丘立杭　闫海锋
（广西壮族自治区农业科学院甘蔗研究所，广西甘蔗遗传改良重点实验室，农业农村部广西甘蔗生物技术与遗传改良重点实验室，广西 南宁 530007）

摘要:【目的】檀香精油的主要活性成分为檀香醇，其生物合成关键酶——檀香烯合酶（SaSSy）基因的转录调控机制尚不清晰。本研究旨在克隆并初步鉴定檀香 *SaSSy* 基因的启动子活性，探索其转录调控特征。**【方法】**采用 Tail-PCR 技术克隆檀香 *SaSSy* 基因 ATG 上游 1 437 bp 的启动子序列；通过生物信息学分析其顺式作用元件及潜在转录因子结合位点，并进行 KEGG 通路富集分析；利用烟草叶片瞬时转化实验验证启动子活性；使用 100 μmol/L 茉莉酸甲酯（MeJA）处理檀香愈伤组织，通过 RT-qPCR 和 GUS 活性检测分析 *SaSSy* 表达及启动子响应；通过启动子截断实验鉴定核心转录调控区域。**【结果】**成功克隆获得 *SaSSy* 基因 1 437 bp 的启动子序列，其顺式作用元件包含光、激素及胁迫响应元件。预测发现与之互作的转录因子主要富集于“植物激素信号转导”“MAPK 信号通路−植物”“植物−病原互作”及“植物昼夜节律”通路。烟草瞬时转化证实该启动子具有转录激活活性。MeJA 处理可显著诱导檀香愈伤组织中 *SaSSy* 基因的表达上调及该启动子驱动的 GUS 活性增强。截断实验表明，−264 bp 的核心启动子区域（P*SaSSy*-D4）即可驱动转录，其活性与克隆的全长启动子相当。**【结论】**本研究揭示了 *SaSSy* 基因启动子的基本特征，证实其表达受 MeJA 正向调控，并确定了包含关键元件的−264 bp 核心启动子区域。该启动子的 MeJA 诱导特性为探索通过外源信号分子提升檀香精油生物合成提供了实验依据，也为进一步解析檀香醇合成的转录调控网络提供了候选靶点。

关键词：檀香烯合酶；*SaSSy* 启动子；遗传转化烟草；茉莉酸甲酯诱导
中图分类号：S718.5　**文献标志码：**A　**文章编号：**1000−1522(2026)06−0049−10
引文格式：周慧文，丘立杭，闫海锋. 檀香烯合酶基因启动子克隆及其活性分析［J］. 北京林业大学学报，2026，48(6)：49−58. Zhou Huiwen, Qiu Lihang, Yan Haifeng. Cloning and its activity analysis of santalene synthase gene (*SaSSy*) promoter from *Santalum album*［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(6): 49−58.

Cloning and its activity analysis of santalene synthase gene (*SaSSy*) promoter from *Santalum album*

Zhou Huiwen　Qiu Lihang　Yan Haifeng
(Sugarcane Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, Key Laboratory of Sugarcane Biotechnology and Genetic Improvement (Guangxi) of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanning 530007, Guangxi, China)

Abstract: ［**Objective**］ The primary active component of sandalwood essential oil is santalol, yet the transcriptional regulatory mechanism of key biosynthetic enzyme gene santalene synthase (*SaSSy*) remains unclear. This study aimed to clone and preliminarily characterize the promoter of *SaSSy* gene in *Santalum album*, and to explore its transcriptional regulatory features. ［**Method**］ The 1 437 bp promoter sequence upstream of ATG start codon of *SaSSy* gene was cloned from *Santalum album* using Tail-PCR. Cis-regulatory element analysis was performed to identify functional motifs. Transcription factor binding sites

收稿日期: 2025−11−03　**修回日期:** 2025−11−30
基金项目: 国家自然科学基金项目（32060358），广西自然科学基金项目（2019GXNSFAA185005）。
第一作者: 周慧文，副研究员。主要研究方向：林木分子生物学研究。Email：zhouhuiwen1990@163.com　地址：530007 广西壮族自治区南宁市大学东路 172 号广西农业科学院甘蔗研究所。
责任作者: 闫海锋，副研究员。主要研究方向：林木分子生物学研究。Email：gstsyhf@163.com　地址：同上。
本刊网址: https://j.bjfu.edu.cn；https://journal.bjfu.edu.cn

were predicted, and KEGG enrichment analysis was conducted to explore associated regulatory pathways. The transcriptional activity of the promoter was verified via transient expression assays in tobacco leaves. Sandalwood calli were treated with 100 μmol/L methyl jasmonate (MeJA), and *SaSSy* expression was analyzed by RT-qPCR. GUS activity driven by the promoter was measured to assess MeJA responsiveness. Truncated promoter versions were constructed to identify functional regions. [**Result**] A 1 437 bp promoter sequence of *SaSSy* was successfully cloned, containing light-, hormone-, and stress-responsive cis-elements. Transcription factor binding site prediction and KEGG analysis revealed enrichment in pathways related to plant hormone signaling, MAPK signaling, plant-pathogen interaction and circadian rhythm. The promoter demonstrated transcriptional activity in tobacco transient assays. MeJA treatment significantly upregulated *SaSSy* expression and enhanced promoter-driven GUS activity. A truncated 264 bp core promoter region (P*SaSSy*-D4) retained full transcriptional activity, comparable to full-length promoter. [**Conclusion**] The present study reveals fundamental characteristics of P*SaSSy*, confirming that its expression is positively regulated by MeJA, and identifies a core promoter region (−264 bp) containing key cis-acting elements. The MeJA-inducible characteristics of P*SaSSy* provide experimental evidence for enhancing sandalwood essential oil biosynthesis through exogenous signalling molecules, and offer a candidate target for further elucidating the transcriptional regulatory network of santalol synthesis.

Key words: santalene synthase; *SaSSy* promoter; transgenic *Nicotiana tabacum*; MeJA induction

檀香(*Santalum album*)主要分布于热带和亚热带地区[1−2],其心材被广泛用于高端艺术雕塑和奢侈家具的制作。而檀香最具经济价值的部分是从其心材中提取的檀香精油。檀香精油以其独特的芳香特征,稀缺性和高昂的经济价值而备受关注,被誉为“液体黄金”,主要应用于香料、化妆品和制药工业[3−5]。檀香精油的主要生物活性成分是檀香醇,其中 α-檀香醇和 β-檀香醇共同占其成分的 70%～90%。檀香烯是檀香醇的直接生物合成前体[1]。在檀香醇生物合成途径中,檀香烯合酶(*SaSSy*)催化倍半萜前体法尼基焦磷酸(FPP)的环化反应,生成檀香烯(包括 α-檀香烯、β-檀香烯及其他相关构型)。随后,檀香烯经过细胞色素 P450 单加氧酶(CYP)催化的羟基化反应,生成相应的倍半萜醇(主要为 α-檀香醇和 β-檀香醇)。因此,在檀香醇生物合成过程中,檀香烯合酶是一个关键的限速酶,它能影响檀香醇生产的关键限速步骤,直接影响 α/β-檀香醇的比例和产量,从而决定檀香精油的品质和经济价值[6−7]。

檀香烯合酶基因(*SaSSy*)属于萜类合酶 a 亚家族(*TPS*-a)。该基因主要分布于檀香属物种中,但在非檀香属植物如毛番茄(*Solanum habrochaites*)[8]和樟树(*Cinnamomum camphora*)[9]中也存在同源基因。对 *SaSSy* 表达的精准调控可优化 α-和 β-檀香烯的产率比例,从而提升檀香醇的合成效率[10]。

启动子作为基因表达的关键调控元件,研究其结构与功能特性有助于阐明基因的调控机制,并解析植物发育与防御的作用机理。前人[11]已从檀香中克隆出介导檀香醇合成途径的多个功能基因启动子。通过将红没药烯合酶基因启动子(P*SaBS*)在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中进行遗传转化,发现 P*SaBS* 可作为水杨酸诱导型启动子,并表现出茎部特异性表达特征[12]。研究发现 *SaCYP*736*A*167 基因的启动子具有组织特异性表达活性,它主要在茎皮层和韧皮部薄壁细胞中发挥功能,其核心启动子区域被确定为翻译起始密码子上游的 936 bp 序列[13]。前人已完成檀香烯合酶基因(*SaSSy*)的克隆与功能鉴定[9, 14],并通过共表达分析筛选,发现 bHLH 转录因子可通过结合其启动子内的 G-box 顺式作用元件激活 *SaSSy* 表达[15],并预测 MYB36-like、HSP20 及 ATHB-15 等其他调控因子可能参与其转录调控[16]。然而,*SaSSy* 启动子(P*SaSSy*)的转录调控机制仍有待实验验证,其功能特性与调控网络尚待系统解析。

本研究通过启动子的克隆和截短实验,首次系统完成了 P*SaSSy* 顺式作用元件的分析鉴定,并验证了其核心功能区域,结合植物激素诱导实验阐明了其激素响应模式,为檀香烯生物合成途径的人工优化提供了精准靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用檀香组织均采自中国科学院华南植物园檀香种植基地的 7 年生檀香树,经液氮速冻后,置于−80 ℃ 超低温冰箱中保存。

1.2 P*SaSSy* 克隆和序列分析

采用天恩泽柱式植物 DNAout 试剂盒(Tiandz, Inc.)提取檀香基因组 DNA。启动子扩增采用热不对

称交叉 PCR(Tail-PCR)技术，根据基因 cDNA 序列设计 3 条特异性引物(Sytail1/2/3)，并合成 5 条随机兼并引物(AD1 ~ AD5)，引物序列见表 1。将经过琼脂糖凝胶电泳验证的扩增产物进行切胶回收后，连接至 pMD19-T 简单载体，转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，筛选获得阳性克隆。将阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司，使用 Sanger 测序法进行测序验证。扩增产物经电泳验证后，利用 Plant CARE 在线工具(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)对 P*SaSSy* 序列进行顺式作用元件预测。利用 PlantPAN 在线网站(http://plantpan.itps.ncku.edu.tw/)预测 *SaSSy* 启动子可能结合的转录因子，物种选择拟南芥。运用 OmicShareTools[17](https://www.omicshare.com/tools)进行转录因子的 KEGG 富集分析和作图。

1.3　含 GUS 质粒和截短片段的制备

根据预测的顺式作用元件结果，通过 5′端缺失截断 *SaSSy* 启动子。使用 6 条添加同源臂的 5′端引物以及相同的 3′端引物(表 1)，利用高保真酶(2 × Es Taq MasterMix, CWBio Co., Ltd.)分别扩增 *SaSSy* 基因的启动子区域，形成 6 个不同的 5′缺失片段(图 1)，即 P*SaSSy* 全长、P*SaSSy*-D1 (−1 270 ~ −1 bp)、P*SaSSy*-D2 (−854 ~ −1 bp)、P*SaSSy*-D3 (−599 ~ −1 bp)、P*SaSSy*-D4 (−264 ~ −1 bp)，P*SaSSy*-D5 (−151 ~ −1 bp)。将扩增的 *SaSSy* 启动子片段克隆至 pCAMBIA1391z 载体(Takara Bio Dalian Co., Ltd.)中，构建 pCAMBIA1391z:P*SaSSy*:GUS 系列截断载体。采用 *Nco* I、*BamH* I 及 *Hind* III 限制性内切酶(New England Biolabs)双酶切进行载体构建，经 T4 DNA 连接酶(New England Biolabs)连接后，转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞(Tiangen Biotech Beijing Co., Ltd.)，筛选阳性克隆。

1.4　檀香愈伤组织的处理

以当年生健康嫩枝为外植体进行愈伤组织诱导，愈伤组织诱导方法见 Yan 等[18]研究。选取生长良好的愈伤组织转移到 MS 液体基础培养基中，以 100

表 1　本实验所用的全部引物

Tab. 1　All primers used in the experiment

引物	引物序列(5′—3′)	功能
1391-P*SaSSy*F	AACTGCAGTCGACGATTGAGAGAGCA	1391z vector
1391-P*SaSSy*R	CGGGATCCTAGTGAGAGAGCTGAGTA	1391z vector
1391-P*SaSSy*-D1F	AACTGCAGAAAGTATAATGAGATAAT	1391z vector
1391-P*SaSSy*-D1R	CGGGATCCTAGTGAGAGAGCTGAGTA	1391z vector
1391-P*SaSSy*-D2F	AACTGCAGAAAATTTGAAGTAGTTGA	1391z vector
1391-P*SaSSy*-D2R	CGGGATCCTAGTGAGAGAGCTGAGTA	1391z vector
1391-P*SaSSy*-D3F	AACTGCAGACTCCTTCATCCATTCTG	1391z vector
1391-P*SaSSy*-D3R	CGGGATCCTAGTGAGAGAGCTGAGTA	1391z vector
1391-P*SaSSy*-D4F	AACTGCAGCAGACCTGGGGGCAGGG	1391z vector
1391-P*SaSSy*-D4R	CGGGATCCTAGTGAGAGAGCTGAGTA	1391z vector
1391-P*SaSSy*-D5F	AACTGCAGTTAAATAAGAAAAAGGAT	1391z vector
1391-P*SaSSy*-D5R	CGGGATCCTAGTGAGAGAGCTGAGTA	1391z vector
Sytail1	GTCCCACCAGCCTCACGC	Tail PCR
Sytail2	TTTCTTACACACTGGTCCGTTG	Tail PCR
Sytail3	TTTCTCTCCTCTCACCTTACCTTT	Tail PCR
AD1	NTCGASTWTSGWGTT	Tail PCR
AD2	NGTCGASWGANAWGAA	Tail PCR
AD3	WGTGNAGWANCANAGA	Tail PCR
AD4	TGWGNAGWANCASAGA	Tail PCR
AD5	AGWGNAGWANCAWAGG	Tail PCR
Sa18S_F	TGACGGAGAATTAGGGTTCG	RT-qPCR
Sa18S_R	GTGCCAGCGGAGTCCTATAA	RT-qPCR
SaSSy-F	ATGGATTCTTCCACCGCCACC	RT-qPCR
SaSSy-R	CTACTCCTCGCCGAGAGGAATAG	RT-qPCR

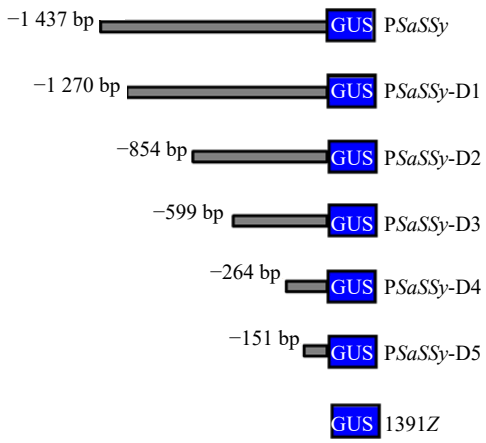


图 1 *SaSSy* 基因截短启动子示意图

Fig. 1 Schematic presentation of truncated promoter of *SaSSy*

r/min 的转速连续摇动 24 h，然后用 50、100 和 200 μmol/L 浓度的 MeJA 分别处理愈伤组织。在 0 和 6 h 收集样品，用液氮速冻后置于−80 ℃ 保存，用于 RNA 提取。采用 Eastep®Super Total RNA Extraction 技术[19]，从檀香愈伤组织中分离总 RNA 试剂盒（Promega，上海，中国）。RNA 质量测定，cDNA 合成和 qRT-PCR 按照 Yan 等[20]的方法进行。用于 RT-qPCR 的基因特异性引物列于表 1。

1.5 烟草瞬时表达与激素处理

将本氏烟草（*Nicotiana benthamiana*）种植于透气性良好的基质中，在 28 ℃、16 h 光照、8 h 黑暗的培养箱中培养，等长到 4~5 片真叶时用于瞬时表达。将重组质粒及 pCAMBIA1391Z 空载体（阴性对照）农杆菌菌液（OD600 = 0.4）经重悬液（10 mmol/L $MgCl_2$、10 mmol/L MES、100 μmol/L 乙酰丁香酮）避光活化后，用注射器吸取 1 mL 重悬菌液，选取长势良好的 4 周左右大小的本氏烟草，从背部轻轻注入菌液，每株注射 3～4 片生长一致的叶片。注射后植株于 28 ℃、16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养 48 h，用于后续 GUS 染色观察和 GUS 酶活性测定。

待烟草瞬时表达植株生长到 48 h 后，每个生物学重复选取 3 株烟草，每 1 株选择 3～4 片已注射的叶片，将其完全浸入含有 100 μmol/L 的 MeJA 的溶液中（对照用加入相应体积的含 2.88 mL/L 乙醇的 ddH_2O 溶液代替），置于培养烟草的培养箱中，在 28 ℃ 光照条件下培养 12 h，然后用液氮迅速冷冻后，置于−80 ℃ 用于 GUS 活性检测。同时以转化了 pCAMBIA1391z 空载体的烟草叶片用 100 μmol/L 的 MeJA 溶液处理，做阴性对照。

1.6 β-葡糖醛酸酶（GUS）组织化学染色与活性检测

按照 GUS 染色试剂盒（Real-Times（Beijing）Biotechnology Co., Ltd.）说明书进行染色，选取瞬时表达的烟草叶片样品，加入配置好的 GUS 染色液以覆盖所有叶片，锡箔纸包裹后在 37 ℃ 摇床摇动至出现蓝色，将材料转入无水乙醇脱色，至阴性对照材料为白色时，用体视镜（XTL-3400，奥卡，广西，中国）采集图像。

GUS 酶活性定量测定通过荧光法进行[13, 21]。取 100 mg 瞬时转化后的本氏烟草叶片，液氮研磨后加入 GUS 提取液（50 mmol/L 磷酸缓冲液、0.1% Sarcosyl、10 mmol/L EDTA、0.1% Triton X-100、10 mmol/L β-巯基乙醇），12 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min 后取上清液。蛋白浓度采用 Bradford 法[22]测定，以牛血清白蛋白（BSA，美国 Sigma-Aldrich）为标准品进行标准曲线计算。GUS 反应体系含 1 mmol/L 4-甲基伞型酮-β-葡糖醛酸苷（4-MUG, Sigma-Aldrich Co. LLC），37 ℃ 温浴后于 0、5、15、30、60 min 取样终止，EnSpire 多功能酶标仪（美国 PerkinElmer）检测 365/455 nm 荧光值。根据 4-MU 标准曲线计算酶活性（nmol /（min·mg）蛋白），数据以 3 次生物学重复的均值 ± 标准差展示。

1.7 数据统计分析

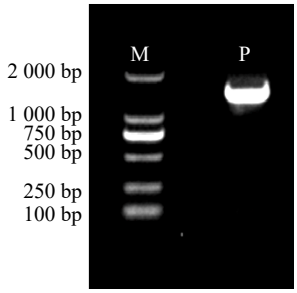
采用 SPSS 20.0 软件（IBM）进行统计分析，用 Graphpad Prism 9.5 进行作图。经单因素方差分析后，采用 Duncan 检验比较组间差异显著性（$p = 0.05$）。

2 结果与分析

2.1 *SaSSy* 启动子的克隆和序列分析

以檀香 DNA 为模板，采用 Tail-PCR 技术成功克隆得到 ATG 起始密码子上游 1 437 bp 的 P*SaSSy* 启动子序列。扩增产物经电泳分析（图 2～3）及测序验证后，提交至 NCBI GenBank 数据库（登录号：MG917672）。

顺式作用元件分析结果表明，P*SaSSy* 序列中元件分布均匀（图 3、表 2）。除核心转录元件（CAAT-box 与 TATA-box）外，该启动子的元件主要分为 3 类，比如光响应元件，包括 AE-box、Box I、CATT-motif、G-box、GA-motif、GATA-motif、GT1-motif、I-box、Sp1 及 TCT-motif。应激响应元件（如防御与胁



M. 分子量标准；P. P*SaSSy*，即 *SaSSy* 启动子。

图 2 *SaSSy* 启动子 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplication of *SaSSy* promoter

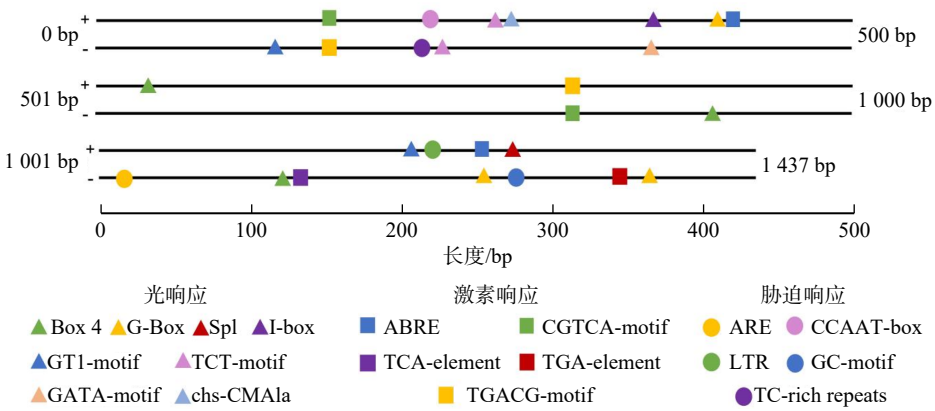


图 3　*SaSSy* 启动子顺式作用元件示意图

Fig. 3　Schematic diagram of cis-acting elements in *SaSSy* promoter

表 2　*SaSSy* 启动子的顺式作用元件

Tab. 2　Cis-acting elements of *SaSSy* promoter

类型	元件	序列	功能
光响应	G-Box	CACGTT	光响应顺式作用调控元件
	G-box	TACGTG	光响应顺式作用调控元件
	G-box	CACGAC	光响应顺式作用调控元件
	GT1-motif	GGTTAA	光响应元件
	GT1-motif	GGTTAAT	光响应元件
	Sp1	GGGCGG	光响应元件
	Box 4	ATTAAT	光响应保守DNA模块的组成部分
	Box 4	ATTAAT	光响应保守DNA模块的组成部分
	Box 4	ATTAAT	光响应保守DNA模块的组成部分
	I-box	CCTTATCCT	光响应元件的组成部分
	TCT-motif	TCTTAC	光响应元件的组成部分
	TCT-motif	TCTTAC	光响应元件的组成部分
	GATA-motif	AAGGATAAGG	光响应元件的组成部分
	chs-CMA1a	TTACTTAA	光响应元件的组成部分
激素响应	TGA-element	AACGAC	生长素响应元件
	TCA-element	TCAGAAGAGG	水杨酸响应顺式作用元件
	ABRE	ACGTG	脱落酸响应顺式作用元件
	ABRE	ACGTG	脱落酸响应顺式作用元件
	TGACG-motif	TGACG	茉莉酸甲酯响应顺式作用调控元件
	TGACG-motif	TGACG	茉莉酸甲酯响应顺式作用调控元件
	CGTCA-motif	CGTCA	茉莉酸甲酯响应顺式作用调控元件
	CGTCA-motif	CGTCA	茉莉酸甲酯响应顺式作用调控元件
生物/非生物胁迫	TC-rich repeats	GTTTTCTTAC	防御及胁迫响应顺式作用元件
	LTR	CCGAAA	低温响应顺式作用元件
	ARE	AAACCA	厌氧诱导必需元件
	GC-motif	CCCCCG	参与缺氧特异性诱导的类似增强子元件
	CCAAT-box	CAACGG	MYBHv1结合位点

迫响应的 TC-rich repeats、低温响应的 LTR、厌氧诱导必需元件 ARE)及激素响应元件(如水杨酸信号响应的 TCA-element、脱落酸响应的 ABRE、茉莉酸甲酯(MeJA)信号响应的 CGTCA-motif 与 TGACG-motif),其中又以响应 MeJA 信号的元件数目最多(4 个)。本研究结果表明,*SaSSy* 基因在功能上整合了光响应、胁迫适应及激素信号转导通路。

P*SaSSy* 启动子区域存在高密度的转录因子结合位点(附表 1)。KEGG 富集分析(图 4a)表明,这些转录因子主要富集于“植物激素信号转导”、“MAPK 信号通路−植物”、“植物−病原体互作”及“植物昼夜节律”4 条通路,其中“植物激素信号转导”通路富集程度最高。进一步分析发现,这 4 个通路通过关键转录因子的交叉参与实现功能互连(图 4b)。具体表现为:bHLH 转录因子(AT1G09530)同时参与“植物激素信号转导”和“植物昼夜节律”通路;EIN3 转录因子(AT2G27050、AT1G73730、AT5G21120、AT5G65100)与 bHLH 转录因子(AT1G32640、AT5G46830、AT5G46760)共同调控“植物激素信号转导”和“MAPK 信号通路−植物”;而 WRKY 转录因子(AT4G23550、AT2G30250、AT2G38470、AT5G52830、AT5G07100、AT4G01250)则在“MAPK 信号通路−植物”和“植物−病原体互作”通路中发挥作用。

2.2 瞬时表达烟草验证 P*SaSSy* 的活性

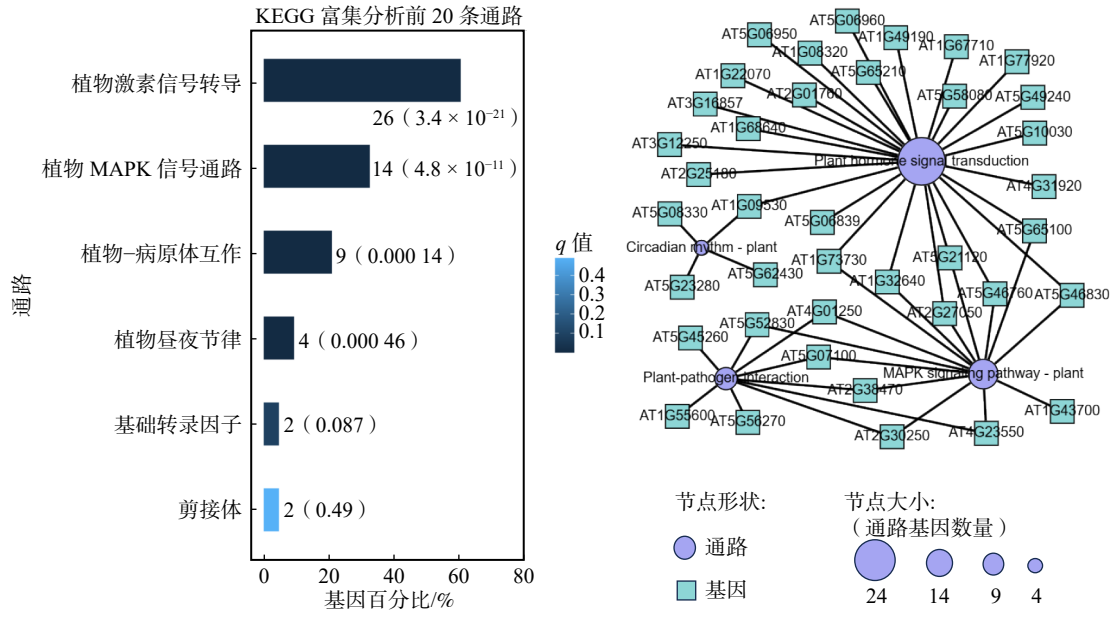
利用 GUS 染色液对瞬时转化后的烟草叶片进行染色,阳性对照 35S::GUS 载体转化后的叶片染色呈现明显的蓝色,阴性对照 GUS 载体转化后叶片未被染成蓝色(图 5a),为了验证克隆的 *SaSSy* 启动子是否具有启动下游基因表达的活性,利用 GUS 染色液对瞬时转化后的烟草叶片进行染色(图 5b)。结果表明,转化 *SaSSy* 启动子的烟草呈现明显的蓝色,而阴性对照 GUS 载体转化后叶片未被染成蓝色,说明克隆的 *SaSSy* 启动子是具有活性的。

2.3 MeJA 处理后 *SaSSy* 启动子的活性变化

因 *SaSSy* 启动子序列中含有的 MeJA 响应元件最多(图 3,表 2),且前人研究表明,MeJA 可显著提高檀香的萜类化合物含量[23−24],说明 *SaSSy* 及其启动子可能响应 MeJA 的诱导。为了验证这一推论,我们检测了 MeJA 对 *SaSSy* 表达量的影响。结果发现,*SaSSy* 在 MeJA 诱导后表达量均有升高,且当浓度为 100 μmol/L 时表达量最高(图 6a),差异达显著水平。对瞬时表达后的烟草叶片用 100 μmol/L 的 MeJA 进行处理,结果显示,转化空载体的叶片在 MeJA 处理下仅观察到微弱的 GUS 活性,与含 2.88 mL/L 乙醇的 ddH_2O 溶液处理的阴性对照无显著差异,表明 MeJA 本身对背景活性无显著影响。然而,在转化了 P*SaSSy* 的叶片中,MeJA 处理下的 GUS 活性显著高于空载体对照组及其自身的对照组(图 6b),证实 P*SaSSy* 是一个受 MeJA 诱导的启动子。

2.4 *SaSSy* 启动子截断验证其核心活性区域

SaSSy 启动子截断验证结果显示,*SaSSy* 启动子全长及其不同截断均有较强的 GUS 活性,其中活性最强的区段是−1 447 bp 的 *SaSSy* 启动子全长片段和−1 270 bp 的 P*SaSSy*-D1 区段;活性相对最弱的是−151 bp 的 P*SaSSy*-D5 区段;从−854 bp 的 P*SaSSy*-



a 转录因子显著富集的信号通路　　b 转录因子与 KEGG 信号通路的富集调控网络

图 4　预测转录因子的 KEGG 富集分析

Fig. 4　KEGG enrichment analysis of predicted transcription factors

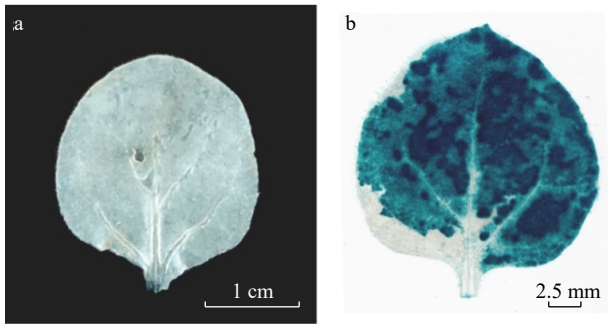


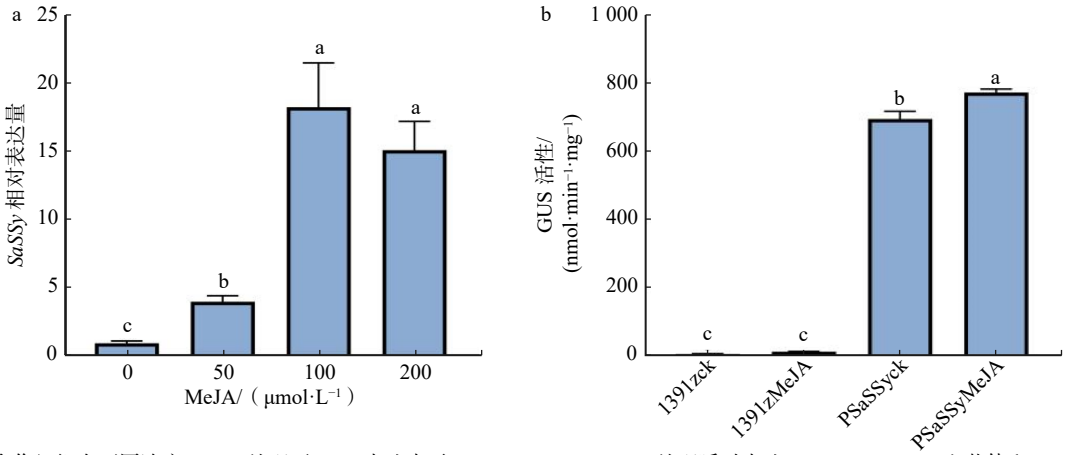
图 5　本氏烟草叶片中瞬时表达 pCAMBIA1391z 空载体（a）和 pCAMBIA1391z:P*SaSSy*:GUS 重组载体 (b) 的 GUS 染色

Fig. 5　GUS staining of *Nicotiana benthamiana* leaves following transient expression of the empty vector pCAMBIA1391z (a) and the recombinant vector pCAMBIA1391z:P*SaSSy*:GUS (b)

D2 区段到−1 270 bp 的 P*SaSSy*-D1 区段之间，启动子活性显著增强，这可能与这一区段含有的 5′UTRPy-richstretch 顺式作用元件有关。通过 GUS 活性显著性分析可以看出，−264 bp 的 P*SaSSy*-D4 区段就可以行使 *SaSSy* 启动子启动下游基因表达的功能（图 7）。

3　讨　　论

基因启动子作为基因 5′端上游的调控区域，由包含核心启动子序列和多种顺式作用元件的特异性 DNA 片段组成，启动子通过特异性结合转录因子，能精确调控基因的时空特异性表达。启动子序列中，顺式作用元件的种类和数量决定着启动子的表达方式[25]。因此，通过系统性鉴定启动子顺式作用元件的类型、分布规律及互作调控模式，不仅可阐明基因转录调控的分子机制，更为作物抗逆性遗传改良和次生代谢工程提供关键调控靶点。本研究通过 PlantCARE 分析发现，*SaSSy* 启动子序列富含多种功能元件，包括光响应元件（如 G-box、Sp1）、激素响应



a. 檀香愈伤组织在不同浓度 MeJA 处理下*SaSSy*表达水平；b. 100 μmol/L MeJA 处理瞬时表达 pCAMBIA1391z 空载体和 pCAMBIA 1391z::P*SaSSy*::GUS 重组载体烟草的荧光 GUS 活性。不同小写字母表示组间差异显著（$p < 0.05$）。

图 6　MeJA 诱导下 *SaSSy* 基因表达水平及其启动子驱动的 GUS 活性

Fig. 6　Expression level of *SaSSy* and GUS activity of its promoter indcuced by MeJA

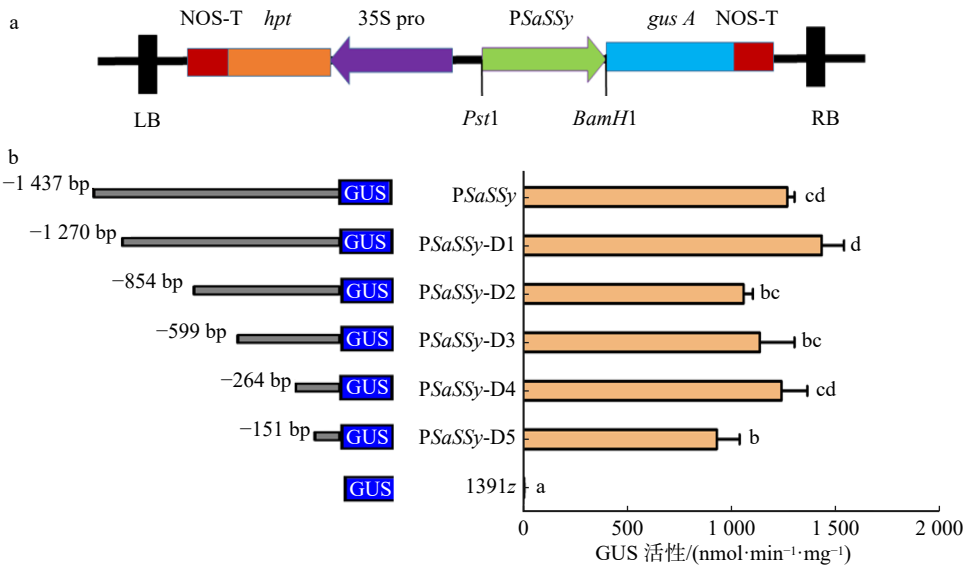


图 7　pCAMBIA1391z:P*SaSSy*:GUS 载体示意图（a）及全长 *SaSSy* 启动子与其缺失片段的 GUS 活性分析（b）

Fig. 7　Schematic presentation of pCAMBIA1391z:P*SaSSy*:GUS vector (a) and GUS activity analysis of full length *SaSSy* promoter and its deletions (b)

元件(MeJA 的 CGTCA-motif、ABA 的 ABRE、SA 的 TCA-element)及逆境胁迫响应元件(如 TC-rich repeats、MBS)。这表明 *SaSSy* 基因的表达可能受光信号、非生物胁迫(缺氧、低温)及多种激素(ABA、MeJA、SA)协同调控。本研究发现,*SaSSy* 启动子含 bHLH 转录因子的典型结合位点(G-box),前人的酵母单杂交实验也证实了 SaMYC1 可特异性结合该元件并激活其活性,其对 *SaSSy* 的激活效率为对照组的 1.85 倍[15]。干旱胁迫下,SaAREB6 表达显著增加,导致 SaCYP736A167 上调,促进了倍半萜前体向檀香醇的生物合成[26]。P*SaSSy* 也含有参与干旱胁迫的 MYB 结合位点 MBS,暗示着 *SaSSy* 基因也可能通过参与檀香中逆境诱导来促进檀香醇生物合成。此外,在启动子中发现了胚乳表达元件 Skn-1-motif,暗示该启动子在种子发育中可能具有特殊功能,但需通过组织特异性实验验证。

对 *SaSSy* 启动子区域进行转录因子结合位点预测,发现显著富集在 4 条 KEGG 通路上的转录因子为 bHLH 转录因子、EIN3 转录因子和 WRKY 转录因子,表明这 3 个转录因子参与了 *SaSSy* 基因的重要的激素信号调控和防御响应等多个生物过程。MYC2/bHLH6(AT1G32640)、 MYC3(AT5G46760)和 MYC5(AT5G46830)是 JA 信号通路的核心转录因子[27−28],调控植物生长发育及胁迫响应[29−31]。比如在柑橘(*Citrus reticulata*)中,MYC2 和 E3 泛素连接酶 PUB21 构成茉莉酸信号通路介导的黄龙病抗性遗传调控网络[32]。EIN3(AT2G27050)是乙烯信号通路关键转录因子,但 MYC2 可以和 EIN3 直接互作,抑制 EIN3 的转录活性[33], MYC2 可以和 F-box 基因 EIN3 BINDING F-BOX PROTEIN1 的启动子结合,促进了 EIN3 蛋白的降解[34]。在长春花(*Catharanthus roseus*)中,CrWRKY1 通过与 CrMYC2 等转录因子互作, 抑制其转录水平来调控单萜合酶的活性,进而调控单萜类的合成[35]。前人已证实 MYC1 能激活 *SaSSy* 活性[15],且本研究也已经证实 *SaSSy* 受 JA 信号调控,因此 *SaSSy* 能否受 MYCs 调控,MYCs 又能否与 EIN3 转录因子和 WRKY 转录因子互作来激活 *SaSSy* 活性,这些问题是下一步研究开展的方向。

前人[23−24]研究表明,MeJA 通过调控萜类生物合成途径关键基因,诱导檀香叶片和心材合成挥发性萜类化合物。本文的实验结果表明,茉莉酸甲酯(MeJA)处理显著上调了 *SaSSy* 基因的表达水平(图 6a),这与前人研究结果[36]一致。MeJA 能显著增强 P*SaSSy* 启动子活性(图 6b),这可能由于该基因的启动子区域预测存在较多的 MeJA 响应元件(如 CGTCA-motif)的缘故(图 3)。鉴于 MYC1 是茉莉酸信号通路的核心调控因子[3],且已被证实可激活 *SaSSy* 活性[15],我们推测这些 MeJA 响应元件可能通过招募 SaMYC1 来介导激素信号转导。值得注意的是,当 MeJA 浓度为 100 μmol/L 时观察到最佳诱导效果,体现了茉莉酸信号通路的剂量依赖性响应特征;而当浓度升至 200 μmol/L 时,诱导效率下降,可能与过量 MeJA 引发的负反馈调控有关。上述结果提示 P*SaSSy* 可能为 MeJA 诱导型启动子,该发现为代谢工程改造、酵母或大肠杆菌异源表达系统构建以及檀香烯异源生产优化提供了关键信息。Ro 等[37]利用诱导型启动子构建了抗疟前体青蒿酸的异源合成途径。

启动子截短分析是研究启动子功能的关键方法[36−38]。截短实验表明,全长 P*SaSSy* 的活性相较于 −1 270 bp 的 P*SaSSy*-D1 片段略有下降,可能归因于 −1 437 bp ~ −1 270 bp 区间存在负调控元件。当截短至−1 270 (P*SaSSy*-D1)~ −854 bp(P*SaSSy*-D2)时,启动子活性显著降低,这很可能与该区间(−1 270~ −854 bp)内密集分布的抑制性元件有关。当截短至 −264 bp(P*SaSSy*-D4)时,该启动子仍保留驱动 GUS 表达的能力(图 7),其活性水平与全长启动子无显著差异,证实−264 bp 片段为 P*SaSSy* 的核心启动子区域。P*SaSSy*-D5 的 GUS 活性显著低于 P*SaSSy*-D4,且在该区域(−264 ~ −151 bp)发现一个未命名调控元件,可能对启动子活性产生负向调控作用。构建短序列启动子(最小启动子)可提高生物合成途径的构建效率[39],例如酿酒酵母 PTEF1 仅需 69 bp 的基础序列即可维持转录活性[40−41]。因此,在后续研究中,可利用−264 bp 核心启动子构建组成型表达载体,以优化檀香烯的异源生物合成。

4 结　　论

本研究成功克隆了檀香烯合成酶基因 *SaSSy* 的启动子(1 437 bp, NCBI 登录号 MG917672)。通过顺式作用元件分析,发现该启动子富含光响应元件(如 G-box、Sp1)、激素响应元件(MeJA:CGTCA/TGACG; ABA: ABRE)及逆境响应元件(如 ARE、LTR)。通过转录因子结合位点预测和 KEGG 富集分析,发现其序列涉及的转录因子参与植物激素信号转导、植物 MAPK 信号通路、植物−病原体互作、植物昼夜节律等多个生物过程。瞬时表达实验证实启动子具有基础转录活性,且受 MeJA 显著诱导。截断分析表明,其核心功能区域为−264 bp(P*SaSSy*-D4)。本研究首次阐明 *SaSSy* 的转录调控特征,为今后优化檀香烯的合成提供了可利用的启动子资源。

参 考 文 献

[1] Baldovini N, Delasalle C, Joulain D. Phytochemistry of the heartwood from fragrant *Santalum* species: a review [J]. Flavour and Fragrance Journal, 2011, 26: 7−26.

[2] Jain R, Nair S. Sandalwood oil for the chemoprevention of skin cancer: mechanistic insights, anti- inflammatory and in vivo anticancer potential [J]. Current Pharmacology Reports, 2019, 5: 345−358.

[3] Jones C G, Ghisalberti E L, Plummer J A. Quantitative co-occurrence of sesquiterpenes: a tool for elucidating their biosynthesis in Indian sandalwood *Santalum album* [J]. Phytochemistry, 2006, 67: 2463−2468.

[4] Viollon C, Chaumont J P. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans* [J]. Mycopathologia, 1994, 128: 151−153.

[5] Benencia F, Courrèges M C. Antiviral activity of sandalwood oil against Herpes simplex viruses-1 and -2 [J]. Phytomedicine, 1999, 6: 119−123.

[6] Celedon J M, Chiang A, Yuen M M S, et al. Heartwood-specific transcriptome and metabolite signatures of tropical sandalwood (*Santalum album*) reveal the final step of (Z)-santalol fragrance biosynthesis [J]. The Plant Journal, 2016, 86: 289−299.

[7] Zha W, Zhang F, Shao J, et al. Rationally engineering santalene synthase to readjust the component ratio of sandalwood oil [J]. Nature Communications, 2022, 13: 2508.

[8] Sallaud C, Rontein D, Onillon S, et al. A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z, Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites* [J]. The Plant Cell, 2009, 21: 301−317.

[9] di Girolamo A, Durairaj J, van Houwelingen A, et al. The santalene synthase from *Cinnamomum camphora*: reconstruction of a sesquiterpene synthase from a monoterpene synthase [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2020, 695: 108647.

[10] Zuo Y, Xiao F, Gao J, et al. Establishing *Komagataella phaffii* as a cell factory for efficient production of sesquiterpenoid α-santalene [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70: 8024−8031.

[11] Juven-Gershon T, Hsu J Y, Kadonaga J T. Perspectives on the RNA polymerase II core promoter [J]. Biochemical Society Transactions, 2006, 34: 1047−1050.

[12] Yan H, Xiong Y, da Silva J A T, et al. Molecular cloning and functional characterization of bisabolene synthetase (*SaBS*) promoter from *Santalum album* [J]. Forests, 2020, 11: 85.

[13] Yan H, Zhang Y, Wei R, et al. Molecular cloning and functional characterization of a cytochrome P450 enzyme (*SaCYP736A167*) promoter from *Santalum album* [J]. Forests, 2024, 15: 1705.

[14] Srivastava P L, Daramwar P P, Krithika R, et al. Functional characterization of novel sesquiterpene synthases from Indian sandalwood *Santalum album* [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 10095.

[15] Zhang T, Chen X, Xiong Y, et al. Identification and functional analysis of *SabHLHs* in *Santalum album* L. [J]. Life, 2022, 12: 1017.

[16] Zhou Y, Li X, Wang D, et al. Identification of transcription factors of santalene synthase gene promoters and *SaSSy* cis-elements through yeast one-hybrid screening in *Santalum album* L. [J]. Plants, 2024, 13(13): 1882.

[17] Mu H, Chen J, Huang W, et al. OmicShare tools: a zero-code interactive online platform for biological data analysis and visualization [J]. iMeta, 2024, 3: e228.

[18] Yan H, Zhang Y, Xiong Y, et al. Selection and validation of novel RT-qPCR reference genes under hormonal stimuli and in different tissues of *Santalum album* [J]. Scientific Reports, 2018, 8: 17511.

[19] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. Physiologia Plantarum, 1962, 15: 473−497.

[20] Yan H, Li M, Xiong Y, et al. Genome-wide characterization expression profile analysis of WRKY family genes in *Santalum album* and functional identification of their role in abiotic stress [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20: 5676.

[21] Jefferson R A. GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. The EMBO Journal, 1987, 6: 3901−3907.

[22] Bradford M M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248−254.

[23] Wang Y, Wu C, Xiong Y, et al. Characterization of four terpene synthase genes involved in nerolidol and linalool biosynthesis in *Santalum album* leaves induced by methyl jasmonate [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2025, 229: 110571.

[24] Li Y, Zhang X, Cheng Q, et al. Elicitors modulate young sandalwood (*Santalum album* L.) growth, heartwood formation, and concrete oil synthesis [J]. Plants, 2021, 10: 339.

[25] Washida H, Wu C Y, Suzuki A, et al. Identification of cis-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene *GluB-1* [J]. Plant Molecular Biology, 1999, 40: 1−12.

[26] Meng S, Lian N, Qin F C, et al. The AREB transcription factor SaAREB6 promotes drought stress-induced santalol biosynthesis in sandalwood [J]. Horticulture Research, 2025, 12(3): uhae347.

[27] Li Z, Huang Y, Shen Z. Advances in functional studies of plant MYC transcription factors [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2024, 137: 195.

[28] Kim Y H, Park C W, Lee K M, et al. The roles of MYC2 transcription factor in JA-signaling pathway in plants [J]. Journal of Plant Biology, 2005, 68: 113−131.

[29] Chakraborty N, Basu R, Ojha M, et al. MYC2-mediated regulation of FLC controls photomorphogenic growth and flowering time [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2025, 43: 1352−1368.

[30] Ramsay N A, Glover B J. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity [J]. Trends in Plant Science, 2005, 10: 63−70.

[31] Zhao P, Yang H, Sun Y, et al. Targeted MYC2 stabilization confers citrus Huanglongbing resistance [J]. Science, 2025, 388: 191−198.

[32] 姬行舟, 崔艳红, 白倩, 等. MeJA 介导的 bHLH 转录因子家族对板栗果实发育和品质的影响 [J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(8): 23−41.
Ji X Z, Cui Y H, Bai Q, et al. Effects of MeJA mediated bHLH transcription factor family on development and quality of *Castanea mollissima* fruits [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(8): 23−41.

[33] Song S, Huang H, Gao H, et al. Interaction between MYC2 and ETHYLENE INSENSITIVE3 modulates antagonism between jasmonate and ethylene signaling in arabidopsis [J]. The Plant Cell, 2014, 26(3): 113−130.

[34] Zhang X, Zhu Z Q, An F Y, et al. Jasmonate-activated MYC2 represses ETHYLENE INSENSITIVE3 activity to antagonize ethylene-promoted apical hook formation in arabidopsis [J]. The Plant Cell, 2014, 26(3): 1105−1117.

[35] Suttipanta N, Pattanaik S, Kulshrestha M, et al. The transcription factor CrWRKY1 positively regulates the terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. Plant Physiology, 2011, 157: 2081−2093.

[36] Chico J M, Lechner E, Fernandez-Barbero G, et al. CUL3BPM E3 ubiquitin ligases regulate MYC2 MYC3 and MYC4 stability and JA responses [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117: 6205−6215.

[37] Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. Nature, 2006, 440: 940−943.

[38] McSwiney C P, Snapp S S, Gentry L E. Use of N immobilization to tighten the N cycle in conventional agroecosystems [J]. Ecological Applications, 2010, 20: 648−662.

[39] Shabbir H M, Gambill L, Smith S, et al. Engineering promoter architecture in *Oleaginous* yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(3): 213−236.

[40] Decoene T, de Maeseneire S L, de Mey M. Modulating transcription through development of semi-synthetic yeast core promoters [J]. PLoS ONE, 2019, 14: e0224476.

[41] Yasmeen E, Wang J, Riaz M, et al. Designing artificial synthetic promoters for accurate, smart and versatile gene expression in plants [J]. Plant Communications, 2023, 4: 100558.

（责任编辑 赵田芸 李 契
责任编委 马履一）